

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-143592

(43)公開日 平成8年(1996)6月4日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 7/06	Z N A	8318-4H		
A 6 1 K 38/00	A D Y			
// A 6 1 K 38/21	A B H			
			A 6 1 K 37/ 02	A D Y
			37/ 66	A B H Z
			審査請求 未請求	請求項の数3 O L (全 6 頁)

(21)出願番号	特願平6-290737	(71)出願人	000002990 帝国臓器製薬株式会社 東京都港区赤坂2丁目5番1号
(22)出願日	平成6年(1994)11月25日	(71)出願人	594193519 石坂 重昭 奈良県大和郡山市矢田山町3-6
		(72)発明者	石坂 重昭 奈良県大和郡山市矢田山町3-6
		(72)発明者	小林 正雄 東京都多摩市桜ヶ丘1-60-50
		(72)発明者	古沢 良雄 神奈川県大和市福田7-22-9
		(74)代理人	弁理士 中村 静男 (外2名)

(54)【発明の名称】 インターフェロン- $\gamma$ 産生促進剤

(57)【要約】

【目的】 I F N- $\gamma$ の産生促進が望ましい疾病の治療  
又は予防に有用な新規な薬剤を提供する

【構成】 アミノ酸配列

Thr-Asp-Asp-Thr-Ala-Ile-Val-Leu-Leu-Lys

からなるペプチドを有効成分とするインターフェロン- $\gamma$ 産生促進剤。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】 アミノ酸配列（配列番号1）

Thr-Asp-Asp-Thr-Ala-Ile-Val-Leu-Leu-Lys

からなるペプチドを有効成分とするインターフェロン- $\gamma$ 産生促進剤。

【請求項2】 正常肝細胞におけるインターフェロン- $\gamma$ の産生を促進する請求項1に記載のインターフェロン- $\gamma$ 産生促進剤。

【請求項3】 インターフェロン- $\gamma$ 産生促進作用に基づく抗ウイルス剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、配列表中の配列番号1で示されるペプチドを有効成分とするインターフェロン- $\gamma$ 産生促進剤に関する。

## 【0002】

【従来の技術及び発明が解決すべき課題】生体は細菌やウイルス等の感染に対し免疫応答反応によって対抗するが、その免疫応答反応の担い手となるマクロファージやリンパ球が産生する液性因子を、一般にサイトカインと呼ぶ。

【0003】サイトカインに分類される物質の中にインターロイキン（以下、「IL」という。）と呼ばれる一群の物質が存在し、それらは、現在インターロイキン1～15（以下、それぞれ「IL-1」～「IL-15」という。）に分類されている。

【0004】IL-1は、リンパ球活性化因子と呼ばれていた物質であり、 $10^{-10}$ モル以下という極微量で、種々の生理活性作用を示し、生体の恒常性維持機構に深く関与していることが知られている。このIL-1の生理活性に着目し、IL-1を医薬品等として利用する研究が進められた。しかし、IL-1は種々の生理活性を有するため、これを生体に大量に投与すると、目的とする作用以外の作用も同時に発現し、生体の恒常性維持が図れなくなるという危険性があった。そこで、その危険性を回避するため、IL-1の持つ生理作用のうちの一部の生理活性作用のみを有する物質（一般に「IL-1様活性物質」と呼ばれている。）をIL-1の代わりに利用する研究が進められた。

【0005】IL-1様活性物質の一つとして配列番号1で示されるポリペプチド（以下、「P-10」という。）が見出され、その生理活性として、特異的抗体産生増強作用及びコンカナバリンA共存下における胸腺細胞に対する増強作用を有することが確認された（特開平3-170498号公報）。

【0006】さらに、最近、P-10が肝癌細胞の増殖を抑制する一方、正常肝細胞の増殖を促進することが報告された（サイトカイン、Vol.6, No.3, 1994:pp265-271（本文献中で、P-10、2と称しているものは本明細書でいうP-10と同一物質である。）。本文献に

は、IL-1は肝癌細胞の増殖を抑制しなかったことも記載されていることから、P-10のIL-1様活性ではない、新たな生理活性が見出された。

【0007】そこで、本発明は、P-10の未知の生理活性を探索すべく、リンパ球等のいわゆる免疫担当細胞ではない、肝細胞に対するP-10の作用を明らかにし、P-10の新たな用途を見出すことを目的とする。

## 【0008】

【課題を解決する手段】本発明者らは、上記目的を達成するため、鋭意研究を重ねた結果、P-10がインターフェロン- $\gamma$ （以下、「IFN- $\gamma$ 」という。）の産生を特異的に促進させることを見出し本発明を完成させた。

【0009】すなわち、本発明は、アミノ酸配列（配列番号1）

Thr-Asp-Asp-Thr-Ala-Ile-Val-Leu-Leu-Lys

からなるペプチド（すなわち「P-10」）を有効成分とするIFN- $\gamma$ 産生促進剤を第一の要旨とする。さらに、本発明は、P-10のIFN- $\gamma$ 産生促進作用に基づく抗ウイルス剤を第二の要旨とする。

【0010】以下、本発明を詳細に説明する。本発明のIFN- $\gamma$ 産生促進剤は、生体の細胞に働きかけ、後述の生理活性を有するIFN- $\gamma$ を細胞に産生させることを促すものである。

【0011】ここで、IFNは、ウイルスや核酸などの刺激を受けた動物細胞が産生し、細胞外に分泌される抗ウイルス蛋白質として見出された物質であり、その後の研究により、抗ウイルス作用のみでなく、抗腫瘍作用や免疫系の活性化等様々な活性を示すことが明らかにされた。IFNは、 $\alpha$ 型、 $\beta$ 型及び $\gamma$ 型に大別され、ウイルス等以外のレクチンやマイトジェンなどの刺激によって、T細胞等から産生されるものを $\gamma$ 型（IFN- $\gamma$ ）と呼ぶ。IFN- $\gamma$ は、抗ウイルス作用は示すが、IFN- $\alpha$ 及び $\beta$ とは構造上の類似性もなく、その作用する細胞上のレセプターも異なっており、その性質や作用もIFN- $\alpha$ 及び $\beta$ とはかなり異なっている。それ故、現在では、IFN- $\gamma$ は、抗ウイルス作用を示すが、インターロイキン類として位置づけられている。

【0012】IFN- $\gamma$ の生理活性としては、上述の抗ウイルス作用、抗腫瘍作用、細胞障害性Tリンパ球の誘導促進作用、ナチュラルキラー細胞活性の誘導作用、好中球の活性化作用、マクロファージの活性化作用、MHCクラスIIの発現促進作用、IL-2リセプターの発現促進作用、Fcリセプターの発現促進作用等が知られている。

【0013】また、IFNは、元々生体の異物に対する防御機構の一端を担う生体内物質であり、極めて選択毒性が高く、生体にとって安全性の高いものである。

【0014】生体細胞を刺激してIFN- $\gamma$ の分泌を促進させる本発明のP-10を有効成分とする薬剤（以

下、「本発明薬剤」という。)は、IFN- $\gamma$ の有する生理活性を当然に引き出しうるものである。従って、本発明薬剤は、抗ウイルス剤、抗腫瘍剤、抗細菌感染症剤として使用できるものである。

【0015】本発明薬剤の有効成分であるP-10の正常細胞に対する安全性は、上述の文献(サイトカイン)及び後述する試験例1によって確認し、IFN- $\gamma$ 産生促進作用は、試験例2及び3の実験によって確認した。

【0016】本発明薬剤は、ヒトその他の温血動物のIFN- $\gamma$ の産生促進が望ましい疾病、例えば癌、ウイルス感染症、細菌感染症(例えば、肝臓腫、肝アメーバー症)等の治療及び予防に適用できるが、特に癌の治療及び、ウイルス感染症の治療及び予防に好適に用いることができる。

【0017】本発明薬剤は、各種剤型、例えば錠剤、顆粒剤、カプセル剤、散剤等の経口剤、注射剤、貼付剤、軟膏等の経皮剤、経粘膜剤、インプラント剤、点眼剤等に調製して用いることができる。

【0018】本発明薬剤の製剤化に当たっては、製薬学的に許容しうる賦形剤、補助剤、他の薬効成分を添加することが可能である。添加する賦形剤等としては、例えば塩化ナトリウム、グリシン、乳糖、マンニトール、ソルビトール、ショ糖、澱粉、デキストラン、ゼラチン等が挙げられる。

【0019】本発明薬剤のP-10含有量は、剤型により異なるが、一般に固体及び半固体形態の場合には製剤重量に対し5~100重量%、また液体形態の場合には0.01~10重量%とすることが望ましい。

【0020】本発明薬剤の投与量は、投与対象となるヒトを含む温血動物の種類、治療又は予防すべき疾患の種類、症状の軽重、投与部位、剤型、医師の判断等により広範に変えることができ、投与量の上限及び下限は固定されないが、本発明薬剤の有効成分であるP-10の量で、一般に1日当たり $5\mu\text{g}$ ~ $10\text{mg}/\text{kg}$ 、好ましくは $10\mu\text{g}$ ~ $4\text{mg}/\text{kg}$ とすることができる。なお、本発明薬剤は、一日当たり上記投与量となるように、一日一回又は数回に分けて投与することができる。

【0021】本発明薬剤は、その有効成分であるP-10の薬効を損なわない限り、他の薬剤、例えば制癌剤、抗ウイルス剤、抗生物質、化学療法剤等の疾病治療剤、

ビタミン剤、糖液等の栄養補給剤などと併用することができる。

【0022】本発明の第二の要旨であるP-10のIFN- $\gamma$ 産生促進作用に基づく抗ウイルス剤(以下、「本発明抗ウイルス剤」という。)は、治療又は予防すべき疾患がウイルス感染症である以外は、上述した本発明薬剤と同様である。すなわち、その投与剤型、P-10含有量、投与量等は、本発明薬剤について説明したとおりである。

【0023】本発明抗ウイルス剤が適用されるウイルス感染症としては、例えば、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、D型肝炎ウイルスによるウイルス性肝炎等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0024】

【実施例】以下、実施例により本発明をより詳細に説明する。

【0025】試験例1：正常マウス肝細胞の増殖におけるP-10の影響

正常マウス肝細胞株であるNCTC Clone 1469(以下、「Clone 1469」という。)の細胞増殖がP-10によってどのような影響を受けるかを試験した。細胞増殖反応は、プロモデオキシウリジンの取り込みにより測定した。

【0026】細胞増殖の検出は、免疫組織化学的検出システム(細胞増殖検出キット、アマシャム社製)を用いて測定した。Clone 1469細胞( $2 \times 10^4$ 個/ml)にP-10を添加し、24穴平底プレート(コニング社製)にて培養し、さらに、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ のプロモデオキシウリジンを添加し、6時間培養した。リン酸緩衝生理食塩水(PBS、pH7.2)で3回洗浄後、細胞を酸-エタノールで30分間固定し、さらに、抗-プロモデオキシウリジンモノクローナル抗体 $100\mu\text{l}/\text{well}$ とペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG $100\mu\text{l}/\text{well}$ を添加し、プロモデオキシウリジンを取り込んだ細胞は0.03% $\text{H}_2\text{O}_2$ 、0.03% $\text{NiCl}_2$ 含有DAB(ジアミノベンジジン)溶液を添加して染色し、顕微鏡下で測定した。

【0027】本試験結果を下記表1に示す。

【0028】

【表1】

5

6

表1: Clone 1469の細胞増殖におけるP-10の影響

P-10濃度( $\mu\text{g/ml}$ )	Clone1469による $7^{\circ}\text{T}$ 行*リンパ球の取り込み(%)
0	45.5 $\pm$ 2.8
10	73.8 $\pm$ 4.0*

\*:  $p < 0.001$ 

【0029】表1の結果から、P-10は正常肝細胞の増殖を促進することがわかる。

【0030】試験例2: P-10が肝癌細胞及び正常肝細胞のサイトカイン分泌に与える影響

肝細胞が分泌することが知られているサイトカインの分泌が、P-10によってどのような影響を受けるかを調べるため、Clone 1469及びマウス肝癌細胞株であるMH134のサイトカイン分泌細胞数の変動をELISPOT (Enzyme-linked immunospot) 法に従い測定した。

【0031】すなわち、サイトカインとしては、ヘルパーT細胞1 ( $T_H1$ ) 由来のIFN- $\gamma$ 及び、ヘルパーT細胞2 ( $T_H2$ ) 由来のIL-4、IL-5及びIL-10を検出した。

【0032】Clone 1469細胞及びMH134細胞にP-10を添加し、42時間培養した。培養液を遠心分離後、細胞を集め、それぞれの細胞を1%ウシ胎児血清含有RPMI 1640培養液(日本製薬社製)に $5 \times 10^4$ 個/0.5mlの濃度で懸濁し、ミリセル(直径12mm)の各well (0.5ml容)に分注し、24穴平底プレート(コーニング社製)中、5%炭酸ガス存在下、37℃で6時間培養した。6時間後に培養液を捨て、ミリセル膜表面をセル・スクラッパー(住友ベークライト社製)にて軽くこすり付着している細胞を除去し、ミリセル膜表面をトリス緩衝生理食塩水(TBS、pH7.6)にて3回洗浄した。

【0033】次いで、ミリセル膜に2%過酸化水素含有TBSを加え、10分間反応させた後、ミリセル膜を1%Tween 20(シグマ社製)含有TBS(TBST)にて5回洗浄した。ミリセル膜に3%ウシ血清アルブミン(BSA)(シグマ社製)含有TBSを加え、37℃で1時間反応させて、ミリセル膜の各wellの膜をブロックした。その後、ミリセル膜をTBSTにて3回洗浄し、各wellにそれぞれビオチン標識抗マウス・IFN- $\gamma$ 抗体、ビオチン標識抗マウス・IL-4抗体、ビオチン標識抗マウス・IL-5抗体及びビオチン標識抗マウス・IL-10抗体(それぞれファーマーゲン社製、500倍希釈したもの)を0.2mlを加えて一昼夜放置した後、ミリセル膜をTBSTにて4回洗浄した。

【0034】各wellは、アビジン・ペルオキシダーゼ(ベクター・ラボラトリー社製、ABCキット)を加えて30分間反応させ、TBSにて3回洗浄し、0.2mg/mlジアミノベンジジン(DAB)及び0.003%過酸化水素含有TBSを加えて10分間反応後、各well中に形成されたスポットを顕微鏡下で計数した。

【0035】形成されたスポットの数は、それぞれのサイトカインを産生している細胞の数に相当する。

【0036】表2に本試験の結果を示す。

【0037】

【表2】

表2: P-10がClone1469及びMH134におけるサイトカインの分泌に与える影響

細胞種	P-10濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	サイトカイン分泌細胞数 (個/ $10^5$ 個細胞)			
		IL-4	IL-5	IL-10	IFN- $\gamma$
Clone 1469	0	100 $\pm$ 20	135 $\pm$ 15	50 $\pm$ 10	240 $\pm$ 80*
	10	115 $\pm$ 5	95 $\pm$ 5	55 $\pm$ 15	510 $\pm$ 70*
MH134	0	150 $\pm$ 10	780 $\pm$ 160	170 $\pm$ 50	260 $\pm$ 100
	10	160 $\pm$ 80	870 $\pm$ 110	149 $\pm$ 30	370 $\pm$ 70

\*:  $p < 0.001$ 

【0038】表2の結果から、Clone1469細胞及びMH134細胞は、P-10の刺激が無くてもサイトカインを分泌している細胞が存在することがわかる。

【0039】正常肝細胞株であるClone1469では、P-10の添加によってIFN- $\gamma$ を分泌する細胞数のみが有意に増加しているが、IL-4、5及び10については対照群と有意差がない。また、肝癌細胞株であるMH134では、いずれのサイトカインについても、P-10の添加によって有意に変動していないことがわかる。

【0040】上記の結果から、P-10は、正常肝細胞のIFN- $\gamma$ の産生を特異的に促進することがわかる。

【0041】試験例3: P-10が正常肝細胞のIFN- $\gamma$ 分泌に与える影響

上記試験例2において、P-10の添加により正常肝細胞Clone1469細胞のIFN- $\gamma$ 分泌が促進されたことが確認された。そこで、本試験においては、正常肝細胞のIFN- $\gamma$ 分泌におけるP-10濃度の影響を調べた。

【0042】試験は、P-10濃度を下記表3に示す濃度とした以外は、試験例2と同様に実施した。本試験結果を表3に示す。

【0043】

【表3】

表3: Clone1469のIFN- $\gamma$ 分泌におけるP-10濃度の影響

P-10濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	IFN- $\gamma$ 分泌細胞数 (個/ $10^5$ 個細胞)
0	240 $\pm$ 80
1	200 $\pm$ 40
10	510 $\pm$ 70*
50	760 $\pm$ 60*
100	710 $\pm$ 110*

\*:  $p < 0.001$ 

【0044】表3の結果から、P-10を10、50及び100 $\mu\text{g/ml}$ 添加した場合、それぞれ対照群の約2.1倍、3.2倍及び3.0倍多くの細胞がIFN- $\gamma$ を分泌していることがわかる。

【0045】以上の試験例から、P-10は、正常肝細胞を刺激してIFN- $\gamma$ の産生を特異的に促進させることが明らかになった。

【0046】

【発明の効果】本発明薬剤は、正常な生体細胞にとって

【配列表】

配列番号(SEQ ID NO): 1

配列の長さ(SEQUENCE LENGTH): 10

配列の型(SEQUENCE TYPE): アミノ酸(amino acid)

配列

Thr Asp Asp Thr Ala Ile Val Leu Leu Lys

1

5

10

安全性が高く、正常な生体細胞、特に肝細胞にIFN- $\gamma$ の産生を促進させることができ、IFN- $\gamma$ の生理活性に基づく有用な薬効を期待できる。

【0047】すなわち、本発明によって、IFN- $\gamma$ の産生促進が望ましい疾病の治療又は予防に有用な新規な薬剤が提供された。

【0048】

30 【表4】